BD BBL Mycoslide

APPLICATION

La **BBL Mycoslide** est une lame immergée à trois faces contenant des milieux destinés à la détection de champignons, notamment des levures, à partir d'échantillons d'urine, d'expectorations, de lavages de gorge, de selles, ainsi que divers autres échantillons prélevés par écouvillonnage.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.

Les champignons filamenteux et les levures sont des pathogènes courants, responsables de nombreux types d'infections locales et systémiques chez les individus immunocompétents et immunocompromis.[1] L'un des pathogènes fongiques les plus fréquents est *Candida albicans*. Chez les patients immunocompromis, il n'est par rare que *C. albicans* et *C. dubliniensis,* soient les agents responsables d'infections localisées et systémiques. Les trois principaux sites anatomiques impliqués dans les cas d'infections locales sont les voies respiratoires, l'appareil génito-urinaire et le tube digestif. Une détermination quantitative des levures isolées à partir de ces sites anatomiques est importante car, si elles sont susceptibles d'être présentes en petites quantités dans la flore normale, leur population augmente de manière significative en cas d'infection.[1-5]

La **BBL Mycoslide** est un support de gélose à trois faces, recouvert par deux milieux fongiques, et par un troisième milieu, destiné à la détection des bactéries éventuellement présentes au sein de l'échantillon. L'intégralité du support de gélose est plongé dans des échantillons liquides, ou ensemencé par striation avec des échantillons prélevés par écouvillonnage. Après l'incubation, les isolats peuvent être dénombrés puis utilisés pour des tests de différenciation et d'identification supplémentaires, et pour réaliser des tests de sensibilité.

Le milieu 1, Malt agar, permet la détection de tous les types de champignons, notamment les moisissures et les levures. L'extrait de malt contient toutes les substances nutritives nécessaires à la croissance des champignons. Le faible pH du milieu entraîne une inhibition partielle à complète des bactéries contaminantes, mais est bien toléré par les champignons. Ce milieu est utilisé pour la détermination quantitative des pathogènes fongiques.

Le milieu 2 est une Malt Agar complémentée en cycloheximide, un inhibiteur des moisissures saprophytes et de certaines levures. La plupart des champignons pathogènes, notamment *Candida albicans,* ne sont pas inhibés dans ce milieu. Cependant, *Cryptococcus neoformans* et certaines *Candida* spp*,* autres que *C. albicans,* qui peuvent également servir d'agents infectieux, sont inhibés par le cycloheximide.

Le milieu 3 est une CLED (Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient) Agar, milieu de culture différentiel servant à l'isolement et à l'énumération des bactéries à partir d'échantillons d'urine. Il peut également être utilisé pour l'isolement de bactéries à partir d'autres échantillons, si ces bactéries sont modérément exigeantes. Sur la **BBL Mycoslide**, le milieu est principalement utilisé pour déterminer la flore bactérienne associée.

La **BBL Mycoslide** est utilisée pour la détection, l'isolement et le dénombrement de champignons à partir de divers sites anatomiques et types d'échantillons. Elle peut également être utilisée comme milieu de transport, pour acheminer les échantillons à partir du cabinet médical jusqu'au laboratoires d'analyse.

REACTIFS

Formules* par litre d'eau purifiée

BBL Mycoslide

Milieu 1 : Malt Agar		**Milieu 2 : Malt Agar avec cycloheximide**		**Milieu 3 : CLED Agar**	
Extrait de malt	30,0 g	Extrait de malt	30,0 g	Peptone de gélatine	4,0 g
Gélose	15,0	Gélose	15,0	Peptone de caséine	4,0
pH 4,1 ± 0,2		Cycloheximide	1,0	Extrait de bœuf	3,0
		pH 4,1 ± 0,2		Lactose	10,0
				L-cystine	0,128
				Bleu de bromothymol	0,02
				Gélose	15,0
				pH 7,3 ± 0,3	

*Ajustées et/ou complémentées en fonction des critères de performances imposés.

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement.

Ne pas utiliser de lames présentant des signes de contamination microbienne, décoloration, dessiccation ou fissure, ou d'autres signes de détérioration.

Respecter les techniques d'asepsie et les mesures de protection contre les risques biologiques tout au long de la procédure. Consulter le document **MODE D'EMPLOI GENERAL** pour plus d'informations sur les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques et l'élimination des produits usagés.

Lors de l'utilisation de **BBL Mycoslide** en tant que milieu de transport entre un cabinet médical et un laboratoire de diagnostic, respecter la réglementation locale en vigueur concernant l'acheminement des échantillons infectieux.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les produits **BBL Mycoslide** dans l'obscurité entre 15 et 20 °C, dans leur emballage d'origine, jusqu'au moment de leur utilisation. Ne pas les congeler, les surchauffer, les laisser se dessécher, ni les soumettre à des variations de température.

Les lames peuvent être ensemencées jusqu'à la date de péremption indiquée (voir l'étiquette de l'emballage), et incubées pendant les durées recommandées.

Les lames non ouvertes provenant de boîtes déjà entamées peuvent être utilisées jusqu'à la date de péremption indiquée, dans la mesure où elles sont conservées dans un lieu propre entre 15 et 20 °C. Une fois ouvertes, les lames doivent être utilisées immédiatement.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Préparer des suspensions des souches mentionnées ci-dessous, jusqu'à obtenir une turbidité équivalente à un standard McFarland 0,5. Pour chaque microorganisme, verser 20 à 25 mL de sérum physiologique à l'intérieur d'un tube (de diamètre suffisamment large pour accueillir un support de gélose **BBL Mycoslide**), puis ajouter 1 mL de la suspension de la souche préparée comme décrit ci-dessus. Ouvrir une **BBL Mycoslide**, retirer le support de gélose, le plonger brièvement à l'intérieur de la suspension de la souche de test, et procéder conformément aux méthodes décrites dans la rubrique **Mode opératoire du test**. Incuber pendant 2 à 5 jours à 35 ± 2 °C. Examiner les surfaces de la gélose comme décrit sous **Résultats et interprétation** afin de rechercher une croissance éventuelle.

Souches	Milieu 1 Malt Agar	Milieu 2 Malt Agar avec cycloheximide	Milieu 3 CLED Agar
Candida albicans ATCC 10231	Croissance	Croissance	Croissance
Aspergillus niger ATCC 16404	Croissance	Inhibition partielle à complète	Croissance
E. coli ATCC 25922	Inhibition partielle à complète	Inhibition partielle à complète	Croissance
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Inhibition partielle à complète	Inhibition partielle à complète	Croissance
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Inhibition partielle à complète	Inhibition partielle à complète	Croissance
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Inhibition partielle à complète	Inhibition partielle à complète	Croissance
Sans ensemencement	Couleur légèrement ambrée	Couleur légèrement ambrée	Jaune-verdâtre

METHODE

Matériaux fournis

BBL Mycoslide. Produits contrôlés microbiologiquement.

Matériaux non fournis

Milieux de culture auxiliaires, réactifs et matériel de laboratoire requis.

Types d'échantillons

La **BBL Mycoslide** convient pour l'isolement et l'énumération de champignons à partir d'échantillons d'urine (provenant du jet urinaire principal ou d'un cathéter, ou prélevés lors d'une ponction vésicale sus-pubienne), d'expectorations, de lavages de gorge, de selles, et de nombreux autres échantillons (p. ex. écouvillons vaginaux). **A ne pas utiliser pour détecter des infections bactériennes.**

Prélèvement et préparation des échantillons

Respecter les techniques d'asepsie lors du prélèvement des échantillons. Utiliser les méthodes standard de prélèvement.[1,6]

L'urine doit être fraîche ou ne pas être âgée de plus de 2 h. Ou alors, les échantillons d'urine peuvent être conservés au réfrigérateur (24 h au maximum) afin d'empêcher une croissance excessive des agents infectieux ou des contaminants avant l'ensemencement.

Expectorations : Ajouter une partie d'expectorations fraîches, spontanées ou provoquées, à une partie d'une solution de trypsine diluée à 0,25 % et agiter pendant 45 min à 37 °C avec des billes de verre stériles. Ou alors, homogénéiser l'expectoration dans un Stomacher pendant 1 min. Si la quantité d'expectorations disponible est faible, elle peut être utilisée sans prétraitement.

Lavages de gorge : Centrifuger le liquide pendant 10 min à 2 000 x g. Jeter la phase liquide, placer le sédiment dans 5 mL de solution de trypsine (0,25 %), ou dans du sérum physiologique, et agiter avec des billes de verre stériles pendant 15 min à 37 °C.

Echantillons fécaux, frais ou conservés en réfrigération depuis 48 h au maximum. Homogénéiser 1 g de matière fécale dans 100 mL de solution de trypsine diluée à 0,25 % contenant des billes de verre stériles, pendant 15 min à 37 °C.

Ecouvillons : Prélever l'échantillon (p. ex. dans la gorge ou le vagin) à l'aide d'un écouvillon et appliquer directement, sans prétraitement, comme décrit ci-dessous. Si un délai est prévisible entre l'instant où le prélèvement est effectué et son ensemencement, il faut placer l'écouvillon dans un milieu de transport approprié.[1,6]

Mode opératoire du test

1. Inspecter visuellement les surfaces de la gélose, sans ouvrir le tube contenant la **BBL Mycoslide**. Eliminer les lames présentant une contraction des milieux ou une contamination.
2. Etiqueter le tube avec le nom du patient, le numéro de l'échantillon et la date de l'ensemencement.

3. Dévisser le bouchon et retirer la lame du tube plastique, en prenant soin de ne pas toucher les surfaces de la gélose.

Ensemencement avec des échantillons liquides (p. ex. urine ou lavages de gorge) :

1. Plonger brièvement la lame à trois reprises dans les échantillons liquides (p. ex. urine ou expectorations prétraitées, lavages de gorge, etc.), pour que les couches de gélose soient complètement ensemencées par le liquide. Veiller à ne pas laisser la lame plus de 10 sec dans le liquide, car les composants du milieu risquent de se diluer et/ou le gel risque de se désolidariser de son support plastique.
2. Si seul un petit volume d'échantillon est disponible, utiliser une pipette ou une seringue stérile pour le recueillir, et rincer complètement les trois milieux.
3. Maintenir le bout de la lame contre le rebord interne du tube afin de permettre à l'excédent de liquide de s'égoutter.
4. Il est possible d'éliminer les dernières gouttes présentes sur l'extrémité de la lame à l'aide d'un mouchoir en papier. Replacer délicatement la lame à l'intérieur du tube en plastique et bien le reboucher.
5. Incuber la lame pendant 48 h à 30 ± 2 °C ou la transmettre après ensemencement à un laboratoire spécialisé. La croissance des champignons filamenteux nécessite parfois une incubation plus longue, notamment en cas d'infections des voies respiratoires inférieures.

Ensemencement avec des échantillons sur écouvillons :

Strier délicatement les trois milieux de culture de la lame avec l'écouvillon.

Résultats et interprétation

Après l'incubation, retirer délicatement la lame du tube afin de lire les résultats. Respecter les techniques d'asepsie tout au long de la procédure d'inspection. Le port de gants chirurgicaux pendant l'inspection est recommandé. Ne pas toucher les surfaces de la gélose !

Milieu 1 (Malt Agar) :

Ce milieu permet de déterminer le nombre total de colonies, pour tous les champignons. Les champignons filamenteux produisent généralement des colonies présentant une surface rugueuse (mycélium aérien). Les colonies sont souvent pigmentées (noires, grises, bleu-vert, jaunes et autres). Les différentes espèces de levures produisent des colonies blanches à crèmes, d'aspect brillant à mat, qui présentent généralement une surface lisse, et dont l'aspect s'apparente aux colonies bactériennes. Des tests supplémentaires sont nécessaires pour une identification complète des pathogènes.[1].

Pour une détermination quantitative, comparer la croissance effective obtenue sur la lame avec les photographies de référence fournies dans le **Guide d'interprétation**, situé à la fin de ce document. En présence d'une croissance importante et d'un nombre élevé de colonies (supérieur à 10^5), les surfaces de la gélose peuvent apparaître complètement recouvertes par un « tapis » de croissance agglomérée.

Se reporter au tableau et aux références pour interpréter la signification clinique des dénombrements de pathogènes dans les échantillons issus de divers sites anatomiques:[1-5]

Type d'échantillon	**Nombre de colonies de levures**		
	Normal[1)]	**Incertain**[2)]	**Significatif au plan clinique**
Urine provenant du jet urinaire principal ou d'un cathéter	$\leq 10^3$/mL	$10^4 – 10^5$/mL	$>10^5$/mL
Urine prélevée par ponction vésicale sus-pubienne	Toute apparition de champignons est significative du point de vue clinique		
Expectorations	$\leq 10^3$/mL	$10^4 – 10^5$/mL	$>10^5$/mL
Lavages de gorge	$\leq 10^2$	$10^3 – 10^4$	$>10^4$
Selles	$\leq 10^3$/g	$10^4 – 10^5$/g	$>10^5$/g [3)]
Echantillons vaginaux	Toute apparition de champignons est significative du point de vue clinique		

Note au bas de la table :
[1)] Des dénombrements faibles peuvent être significatifs chez les patients prétraités ou chez ceux atteints d'infections chroniques.
[2)] Réévaluer si possible.
[3)] La thérapeutique mise en place pour les patients dont les selles présentent des dénombrements importants de levures, doit être soigneusement évaluée. Il n'est pas rare d'obtenir des populations de levures importantes dans les selles de patients prétraités avec des antimicrobiens antibactériens. En principe, le compte des levures revient à un niveau normal dès la thérapie antimicrobienne achevée. Chez les patients immunocompromis, même une énumération faible peut révéler une infection.[1,3]

Milieu 2 (Malt Agar avec cycloheximide) : Ce milieu permet d'éliminer les champignons filamenteux sensibles au cycloheximide (p.ex. les moisissures comme l'*Aspergillus*). Certaines levures sont également inhibées par cet additif. La résistance au cycloheximide est une caractéristique importante pour la différenciation des champignons :

	Microorganismes[1)]	**Signification clinique et fréquence**
Résistants au cycloheximide	*Candida albicans*	Pathogène important ; fréquent
	C. dubliniensis	Souvent détecté chez les patients infectés par le VIH
	C. guilliermondii	Rare, faible
	C. kefyr (=C. pseudotropicalis)C. kefyr (=C. pseudotropicalis)	Rare, faible
	Other speciesAutres espèces	Rare
sensible au cycloheximide	*Candida tropicalis*	Rare, faible
	C. krusei	Relativement fréquent, pathogène connu
	C. parapsilosis	Rare, pathogène connu
	Candida (Torulopsis) glabrata	Relativement fréquent, pathogène connu
	Cryptococcus neoformans	Rare ; pathogène important
	Aspergillus, Penicillium, et autres champignons	*Aspergillus* peut provoquer une infection des voies respiratoires inférieures ou d'autres infections. Ces champignons peuvent aussi être présents en tant que contaminants.

[1)] Noter que la croissance ou l'inhibition observée dans ce milieu ne se limite pas aux espèces répertoriées dans ce tableau. Les microorganismes mentionnés sont fréquemment présents dans les échantillons cliniques. Pour plus d'informations, consulter les documents cités en référence.[1,7]

Le milieu 3 (CLED Agar) est utilisé pour la détermination quantitative du nombre de bactéries présentes dans l'échantillon. Ces chiffres peuvent être importants car ils permettent d'évaluer la relation entre la croissance bactérienne et la croissance fongique, notamment dans les selles.

Noter que des tests supplémentaires, tels que des procédures biochimiques et/ou microscopiques, sont nécessaires pour obtenir une identification complète des pathogènes isolés sur cette lame immergée.[1] La plupart de ces méthodes sont uniquement applicables en laboratoire de diagnostic et ne peuvent pas être réalisées dans un cabinet médical standard. Par conséquent, toutes les lames immergées présentant des résultats nettement positifs ou indéterminés doivent être transmises à un laboratoire d'analyse à même d'exécuter les tests mycologiques.

Après utilisation, autoclaver ou incinérer tous les tubes usagés et tout autre matériel contaminé, avant de les éliminer. Pour plus d'informations, voir le document **MODE D'EMPLOI GENERAL**.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

La **BBL Mycoslide** est utilisée pour la détection, l'isolement et l'énumération de champignons, notamment des levures, à partir d'échantillons d'urine, d'expectorations, de lavages de gorge, de selles et de nombreux autres. Les milieux contenus sur cette lame immergée sont des milieux standard couramment utilisés pour l'isolement des groupes bactériens et fongiques correspondants.[1, 8-10]

Quelquefois, la croissance des bactéries observée dans les milieux de culture fongique (milieux 1 et 2) de cette lame immergée n'est pas totalement inhibée. En cas de doute, il convient d'effectuer une coloration de Gram ou au bleu de méthylène sur les colonies suspectes.

La plupart des espèces bactériennes moins exigeantes se développent dans le milieu 3 (CLED Agar). Toutefois, ce milieu ne favorise pas la croissance de microorganismes tels que les *Neisseria* spp. pathogènes, *Haemophilus*.spp. et d'autres. Les streptocoques bêta-hémolytiques se développent difficilement dans ce milieu. Par conséquent, une gélose au sang ou au chocolat doit être inclue, lorsqu'une infection bactérienne liée à ces microorganismes est présumée. Sur la **BBL Mycoslide**, la CLED Agar sert principalement à déterminer la flore bactérienne associée. Pour établir un diagnostic exact des infections bactériennes, l'utilisation d'autres systèmes et milieux est recommandée. Les systèmes **BBL Urotube** doivent être utilisés pour diagnostiquer des infections bactériennes à partir d'échantillons d'urine. Le traitement des échantillons issus d'autres sites anatomiques et destinés à la détection des infections bactériennes, doit être effectué dans des boîtes de Pétri contenant des milieux adaptés à la nature des échantillons.

Le nombre d'espèces susceptibles de se développer dans les milieux fournis avec cette lame immergée est important et ne se limite pas à celles mentionnées dans la rubrique **Résultats et interprétation**. Seuls des laboratoires d'analyse sont en mesure de garantir une identification exacte de nombreux microorganismes. Par conséquent, les lames doivent être expédiées dans des structures de ce type, dès l'ensemencement ou après un ensemencement suivi d'une période d'incubation.

La **BBL Mycoslide** convient à l'isolement primaire et au dénombrement. Pour réaliser des tests supplémentaires, en particulier si des cultures mixtes sont observées dans les milieux de ce système, repiquer dans des milieux d'étalement appropriés, afin d'obtenir des cultures pures, indispensables à l'identification complète et à la réalisation de tests de sensibilité.[1]

Les lames immergées ne doivent pas être utilisées pour effectuer des tests de sensibilité sur disque.

REFERENCES

1. Fromtling, R.A. (section editor). 2003. Mycology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Halle, E., et al. 2000. Genitalinfektionen Teil I und II. In: Mauch, H., Lüttiken, R., and S. Gatermann (eds.): MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, vol. 10 and 11. Urban & Fischer, Munich, Germany.
3. Kist, M., et al. 2000. Infektionen des Darmes. In: Mauch, H., Lüttiken, R., and S. Gatermann (eds.): MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, vol. 9. Urban & Fischer, Munich, Germany.
4. Podbielski, A., et al. 2000. Infektionen des Mundes und der oberen Atemwege. In: Mauch, H. and R. Lüttiken (eds.): MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, vol.13. Urban & Fischer, Munich, Germany.
5. Mauch, H., et al. 2003. Infektionen der tiefen Atemwege Teil II. In: Mauch, H., Lüttiken, R., and S. Gatermann (eds.): MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, vol. 8. Urban & Fischer, Munich, Germany.
6. Sutton, D.A. 2003. Specimen collection, transport, and processing: mycology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Hazen, K.C. 1995. New and emerging yeast pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 8: 462-478.

8. *MacFaddin, J. D. 1985. Media for isolation-cultivation-identification- maintenance of medical bacteria, vol. 1, p. 275-284. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.*
9. Larone, D.H. 1995: Medically important fungi - a guide to identification. 3rd edition. ASM Press, Washington.
10. Atlas, R.M. 1993. Handbook of Microbiological media. CRC Press, Boca Raton, FL.

CONDITIONNEMENT

BBL Mycoslide
N° réf. 273157 10 lames

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Pour plus d'informations, contacter le représentant local de BD.

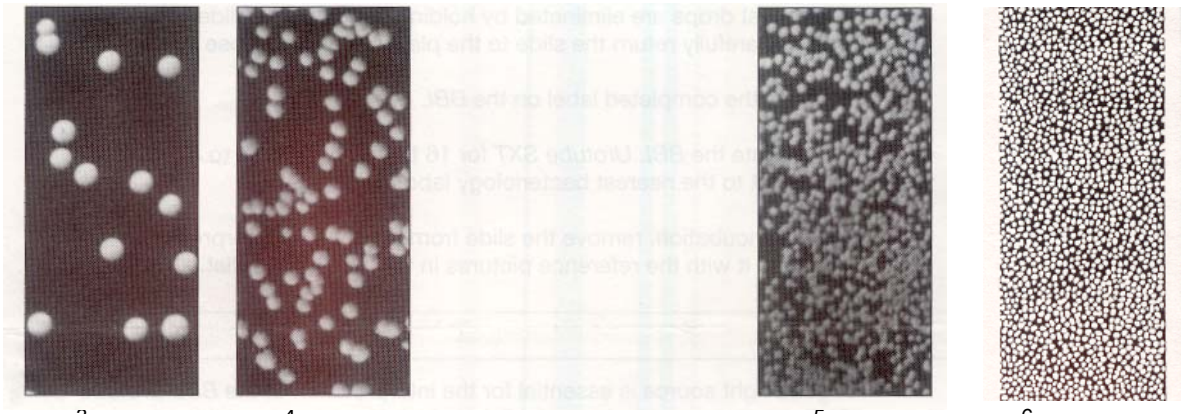
BD Diagnostic Systems
Tullastrasse 8 – 12
D-69126 Heidelberg/Germany
Phone: +49-62 21-30 50, Fax: +49-62 21-30 52 16
Reception_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe
Becton Dickinson France SA
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix/France
Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 http://www.bd.com

BD, BD logo and BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company.
Urotube and Mycoslide are trademarks of Becton Dickinson GmbH.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
© 2003 Becton, Dickinson and Company

GUIDE D' INTERPRETATION (Malt Agar, milieu 1)

Pour la détermination quantitative du dénombrement cellulaire (voir la rubrique **Résultats et interprétation** pour les dénombrements significatifs sur le plan clinique)



10^3 10^4 10^5 10^6